

# 基板上に結合制御した色素分子複合体の発光画像計測から 何が言えるか？

真下 景, 小田 勝\*, 谷 俊朗\*

東京農工大学大学院 工学府 物理システム工学専攻, \*ナノ未来科学研究拠点  
〒184-8588 東京都小金井市中町2-24-16

## To what extent we can be seen from photoluminescence imaging of molecular complexes linked with a silica glass substrate?

K. Mashimo, M. Oda, T. Tani

Department of Applied Physics, \*Strategic Research Initiative for Future Nano-  
Science and Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology.  
Naka-cho 2-24-16, Koganei, Tokyo, 184-8588, Japan

### Abstract

We have been investigating photoluminescence properties from single molecules which linked with silica glass surface by a propyl chain. The dyes have two isomers, which will provide photophysically different nature in the case forming a kind of complex as above. We try to detect the difference of photoluminescence intensity between them with our improved single molecule microscope imaging technique. Histogram of the photoluminescence intensities from single molecules show distinctive separated bands in the distribution. It may suggest that the distribution of the isomers can be due to the small photophysical difference and can be detectable with our technique.

### 1. はじめに

本研究は、1分子イメージングの手法による分子発光画像から位置情報だけでなく分子自体と周辺の局所環境情報を含めた精密光物理計測の可能性を探求し、色素分子を微環境センサーとして高度利用することを目標としている。現在は、意図的に差異を組み込んだモデル系を作製し、その分子間相互作用を検出することを当面の目標として、精密物性計測の可能性を検証することに適した試料作製方法、計測光学系の構築、解析・評価方法の確立といった一連の技術の形成を図ることで実験を進めている。

### 2. 実験光学系

我々の実験で用いている光学系の基本的な構成について説明する。本研究ではプリズムを介した全反射照明蛍光法を用いており、試料の励起はレーザーを全反射させた際に発生するエバネッセント光を利用している。これにより背景光を極力抑え、1分子からの微弱な発光像を効率よく得るための助けとしている(図1)。発光を捉えるための顕微鏡としては一般的な生物顕微鏡(TE2000-U, Nikon)を用いており、光学系全体として非常に簡素なつくりとなっている(図2)。検出には高効率な2D-CCD(Cascade512B, Roper Scientific)を用いてシームレスな連続画像(各積分時間100[ms])として発光を捉えている。

### 3. 試料作製

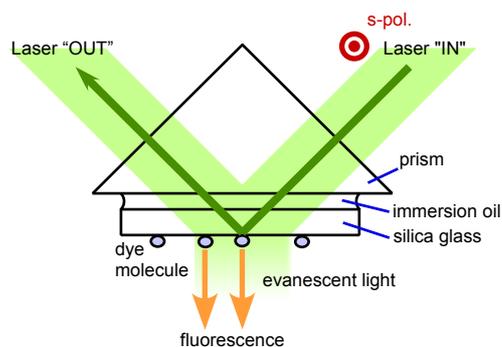


図1. 単一分子試料励起の模式図

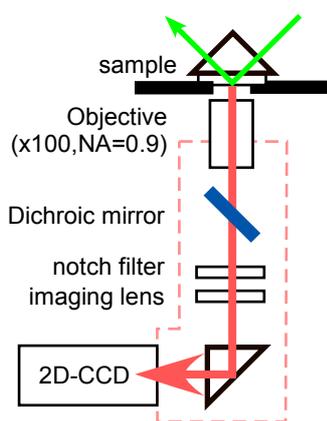


図2. 測定光学系

意図的に差異を組み込んだモデル系試料としては、結合に関する官能基の位置が異なる2種類の異性体が存在するローダミン系の色素、carboxytetramethylrhodamine, succinimidyl ester(TAMRA-SE)をシランカップリング剤である3-aminopropyltriethoxysilane(3-APTEOS)を用いて石英基板へと架橋したものを作製した[1](図3)。結合反応はエタノール中ウェットプロセスで行った。試料は5-TAMRA, 6-TAMRAの2種類の異性体混合試料、一方の異性体だけの試料と複数種類用意し、それぞれでの比較を可能とした。

本研究における1分子イメージングの検出光学系は分解能が光の回折限

界に制限される遠視野顕微鏡を用いているため、試料において分解能(380[nm])内に存在する色素分子が1つ以下となるような十分な分散性が必要とされる。そのような分散性を得るために、我々は結合反応を起こす反応場中の色素の濃度を $10^{-9}$ [M]として1分間反応させることで試料を作製した。

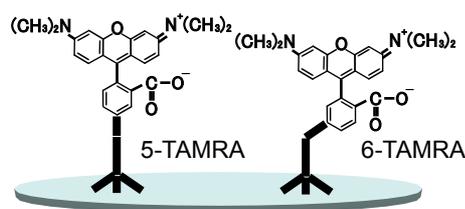


図3. 差異を組み込んだモデル系

### 4. 結果・考察

我々はこれらの計測により得られた発光画像から効率的に輝点を選び出し、その発光の振る舞いについて解析・評価するために独自にプログラムを作成した。発光画像の一例を図4へと示す。ここに見られる発光点(輝点)は回折限界程度の広がりを持っており、また、単一分子系で特有に観測される発光の明滅現象が確認されたことから(図5)1分子発光が捉えられたと考えられる。これらの輝点の強度がどのように時間推移してゆくのかをみると、何度も明滅をするものや一定強度で長く光り続けるもの、発光強度が揺らぐもの、わずかな間しか光らないものなど、多様な振る舞いが観測された。このような個々の分子の発光の様子が多彩に観られた要因はいまだ明確になってはいないが、色素分子の熱的な揺らぎや大気分子のアタック、光化学的変化などが考えられる。また、

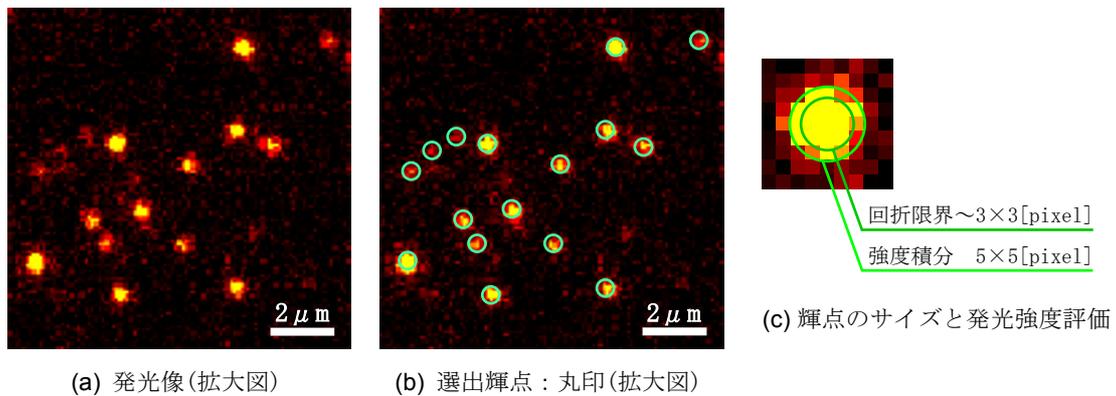


図4. 測定画像の一例

各々の輝点について発光強度ごとにヒストグラムをとるとその強度の分布には複数の成分が存在することが確認された. 図6に2種類の異性体混合試料を測定したときの輝点強度ヒストグラムを示す. この図から判るように異性体混合試料では仕込ん

だ発光成分は2つであるのに対して得られた強度分布には3つの成分がみられた[2]. 我々は現在, この結果に対する解釈として以下のようなフォトセレクションの考えを適用している.

測定系において, プリズムに入射させるレーザーの偏光方向は全反射面に対してS偏光となっており, このとき発生するエバネッセント光の偏光方向も入射光と同様のS偏光となる. これに対して基板に結合された色素分子の遷移双極子モーメントは基板面と平行な面内に存在し, かつ, それぞれが任意の方向に等方的に存在していると考えれば, 励起光の偏光方向と分子の遷移双極子モーメントの向きとのマッチングにより発光強度が異なってくる. その強度は2つのなす角を $\theta$ としたとき $\cos^2 \theta$ に比例するものとなり(図7(a)), 強度の状態密度をとると2つのピークが現れる(図7(b)). これにより, 2種の異性体混合試料の発光強度ヒストグラムでは, 4つの成分から成ると考えられるが, ここでは低強度成分は等しい位置に来るので, それぞれの異性体からの低強度成分の重なりと各々の高強度成分を

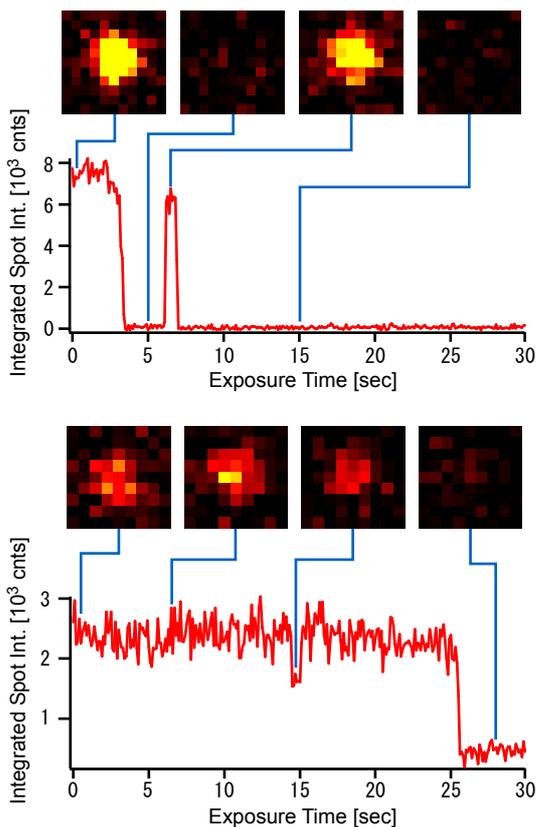


図5. 輝点の発光強度の時間変化(一例)

合わせた3成分からできたものと考えている。一方で、5-TAMRAのみで作製した試料においてはその発光強度ヒストグラムは2つの成分から成ることが確認された。このように5-TAMRAと6-TAMRAの2つに発光強度差が現れるのは、2つの異性体は基板との結合位置が異なるため無輻射緩和過程へ入る確率に違いができていないのではないかと考えられる。以上からこの強度ヒストグラムに見られる強度分布の成分が異性体によ

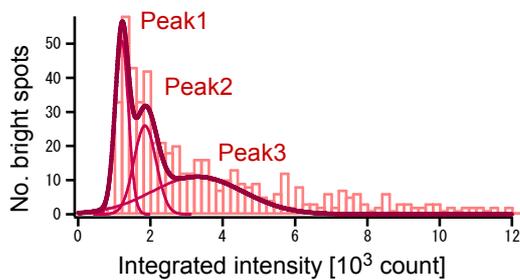
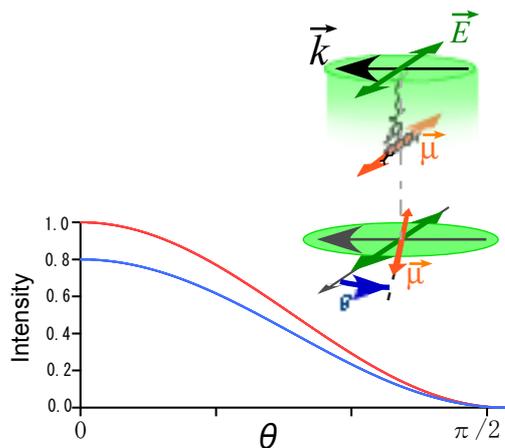
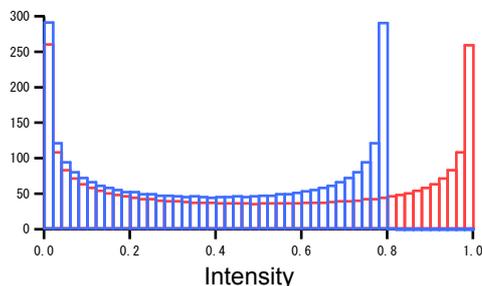


図6. 輝点の強度ヒストグラム



(a) 発光強度の角度( $\theta$ )依存性



(b) 発光強度の状態密度

図7. フォトセレクション

る微小な結合の差異が発光強度のわずかな差となって捉えられたことを示唆するものとする。

## 5. まとめ・発展

これまで行ってきた室温下・大気中といった一般的な条件下での実験において、石英基板に結合した複数の単一色素を同時に時間的にシームレスな連続画像として観察することができた。異性体混合試料の輝点の発光強度分布に複数の成分が確認され、これらは異性体の結合差による分子と基板の分子間相互作用の違いを検出できたことを示唆するものであると考えられる。そこで、これまでの計測は大気中において直線偏光励起した石英基板結合色素の発光の振る舞いを見てきたということを踏まえ、現在、無偏光励起または溶媒中といった異なる条件下での調査も進めており、ヒストグラム成分が異性体の結合差によるものであるのかといったことに対してより詳細な検討をすべく、また、新たな知見を得るべく実験と解析を行っている。

## 参考文献

- [1] M. Ishikawa, et al., Jpn.J.Apple.Phys.41, 1579-1586(2002)
- [2] T. Tani, et al., J.Lumin. 119-120, 173-177(2006).